

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-257896

(43)公開日 平成10年(1998)9月29日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>  
C 1 2 N 15/09  
C 0 7 H 21/04  
C 1 2 N 9/10  
// (C 1 2 N 15/09  
C 1 2 R 1:91)

識別記号  
ZNA

F I  
C 1 2 N 15/00  
C 0 7 H 21/04  
C 1 2 N 9/10

ZNAA  
B

審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 22 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平9-146815

(22)出願日 平成9年(1997)6月4日

(31)優先権主張番号 特願平9-6522

(32)優先日 平9(1997)1月17日

(33)優先権主張国 日本 (J P)

(71)出願人 000195524

生化学工業株式会社  
東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号

(72)発明者 小林 政

愛知県愛知郡長久手町長湫打越38-2 口  
一木金子102

(72)発明者 羽淵 弘子

愛知県名古屋市昭和区八事富士見703番地  
(72)発明者 木全 弘治

愛知県名古屋市天白区植田山1丁目1404番  
地

(74)代理人 弁理士 遠山 勉 (外2名)

(54)【発明の名称】 グリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチド及びそれをコードするDNA

(57)【要約】

【課題】 ヘパラン硫酸に含まれるL-イズロニ酸残基の2位の水酸基に硫酸基を選択的に転移するヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素(HS2ST)をコードする塩基配列を有するDNAを提供する。

【解決手段】 チャイニーズハムスターの卵巣細胞からHS2STを部分精製してその部分的アミノ酸配列を決定し、その配列に基づいて作成したオリゴヌクレオチドプライマーを用いたPCRにより上記細胞から調製したポリ(A)<sup>+</sup>RNAからHS2ST部分的cDNAを増幅し、得られたcDNA断片をプローブとするハイブリダイゼーションによりcDNAライブラリーからHS2ST完全長cDNAを得た。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号14に示すアミノ酸配列を有し、硫酸基供与体から硫酸基を、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれるL-イズロン酸残基の2位の水酸基に転移する酵素活性を実質的に害さない1つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を有していてもよいグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドの少なくとも一部をコードする塩基配列を有するDNA。

【請求項2】 配列番号14に示すアミノ酸配列の少なくとも一部をコードする塩基配列を有する請求項1記載のDNA。

【請求項3】 配列番号2に示すアミノ酸配列を有し、硫酸基供与体から硫酸基を、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれるL-イズロン酸残基の2位の水酸基に転移する酵素活性を実質的に害さない1つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を有していてもよいグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドの少なくとも一部をコードする塩基配列を有するDNA。

【請求項4】 配列番号2に示すアミノ酸配列の少なくとも一部をコードする塩基配列を有する請求項3記載のDNA。

【請求項5】 配列番号4に示すアミノ酸配列を有し、硫酸基供与体から硫酸基を、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれるL-イズロン酸残基の2位の水酸基に転移する酵素活性を実質的に害さない1つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を有していてもよいグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドの少なくとも一部をコードする塩基配列を有するDNA。

【請求項6】 配列番号4に示すアミノ酸配列において、アミノ酸番号1～356で表されるアミノ酸配列の少なくとも一部をコードする塩基配列を有する請求項5記載のDNA。

【請求項7】 以下の性質を有するグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA。

①作用：硫酸基供与体から硫酸基を、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれるL-イズロン酸残基の2位の水酸基に選択的に転移する。

②基質特異性：ヘパラン硫酸およびCD4SNS-ヘパリンには硫酸基を転移するが、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸およびケラタン硫酸には硫酸基を転移しない。

③至適反応pH：pH 5.0～6.5付近

④至適反応イオン強度：50～200mM付近（塩化ナトリウムの場合）

⑤阻害及び活性化

プロタミンを共存させることにより酵素活性が増大す

2

る。アデノシン-3'，5'-ジリン酸(3'，5'-ADP)を共存させることにより酵素活性が阻害される。

10 mM以下のジチオスレイトール(DTT)を共存させることによってはほとんど酵素活性に影響を受けない。

⑥分子量：N-グリコシダーゼ処理後の非還元条件下でのSDS-ポリアクリラミドゲル電気泳動により推定される分子量：約38,000。

【請求項8】 チャイニーズハムスター又はヒト由来である請求項7記載のDNA。

【請求項9】 配列番号14に示すアミノ酸配列を有し、硫酸基供与体から硫酸基を、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれるL-イズロン酸残基の2位の水酸基に転移する酵素活性を実質的に害さない1つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を有していてもよいグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドの全部又は部分からなるポリペプチド。

【請求項10】 配列番号2に示すアミノ酸配列を有し、硫酸基供与体から硫酸基を、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれるL-イズロン酸残基の2位の水酸基に転移する酵素活性を実質的に害さない1つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を有していてもよいグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドの全部又は部分からなるポリペプチド。

【請求項11】 配列番号4に示すアミノ酸配列を有し、硫酸基供与体から硫酸基を、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれるL-イズロン酸残基の2位の水酸基に転移する酵素活性を実質的に害さない1つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を有していてもよいグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドの全部又は部分からなるポリペプチド。

【請求項12】 配列番号4に示すアミノ酸配列を有し、硫酸基供与体から硫酸基を、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれるL-イズロン酸残基の2位の水酸基に転移する酵素活性を実質的に害さない1つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を有していてもよいポリペプチドを含むグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素。

【請求項13】 請求項7又は8記載のDNAが有する塩基配列によってコードされるグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドの全部又は部分からなるポリペプチド。

【請求項14】 請求項1～8のいずれか1項に記載のDNAで形質転換された細胞を、好適な培地で培養し、該DNAが有する塩基配列によってコードされるグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドを培養物中に生成蓄積させ、その培養物から前記ポリペプチドを採取することを含む、ポリペプチドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の属する技術分野】本発明は、グリコサミノグリカン硫酸基転移酵素（グリコサミノグリカンスルホトランスフェラーゼ）のポリペプチド及びそれをコードする塩基配列を有する新規なDNAに関するものである。より詳しくはヘパラン硫酸に含まれるL-イズロン酸の2位の水酸基を選択的に硫酸化するチャイニーズハムスター及びヒト由来のヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素のポリペプチド及びそれをコードする塩基配列を有するDNAに関するものである。また、本発明は、該DNAを利用するグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドの製造方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】ヘパラン硫酸は、ヘキスロン酸（Hexose）残基（D-グルクロン酸（Galactose）残基またはL-イズロン酸（Iduronic acid）残基）とN-アセチルグルコサミン残基（Glucosamine）の二糖の繰り返し構造（4Galactose-1/I doxyl-1→4 Glucosamine-1）を基本骨格とし、そのヘキスロン酸残基の2位の一部およびN-アセチルグルコサミン残基の2位と6位の一部のそれぞれに硫酸基を有するグリコサミノグリカンの一種である。

【0003】グリコサミノグリカン硫酸基転移酵素の遺伝子がクローニングされることにより、硫酸基受容体となるグリコサミノグリカンに対する該酵素の基質特異性についての情報を得ることが可能となり、グリコサミノグリカンの構造と機能の関係を研究する上で有用なアプローチが提供されると考えられる。グリコサミノグリカンの生合成、その中でもヘパリン/ヘパラン硫酸の生合成には多くの硫酸化のプロセスがあることが知られており（木幡陽、箱守仙一郎、永井克孝編、グリコテクノロジー⑤、57頁、1994、講談社サイエンティフィック発行）、この硫酸化には様々なグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素が関与しているものと考えられる。ヘパリン/ヘパラン硫酸に硫酸基を転移するグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素としては、ヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素（以下、「HS2ST」と略記することもある）およびヘパラン硫酸6-O-硫酸基転移酵素（以下、「HS6ST」と略記することもある）が単離されている。しかしながらcDNAのクローニングは困難である。

【0004】本発明者らは既に硫酸基供与体である3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸から硫酸基を、硫酸基受容体であるヘパラン硫酸に含まれるL-イズロン酸残基の2位の水酸基に選択的に転移するヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素をチャイニーズハムスターの卵巢由来の培養細胞（CHO細胞）から精製している（Kobayashi, M., Habuchi, H., Habuchi, O., Saito, M., and Kimata, K. (1996) J. Biol. Chem. 271, 7645-7653）。しかしながら、該酵素のクローニングは未だなされていなかった。また、ヒト由来のヘパラン硫酸2-O

10

20

30

30

40

50

-硫酸基転移酵素及びそれをコードするDNAは未だ得られていなかった。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】ヘパラン硫酸に含まれるL-イズロン酸残基の2位の水酸基に硫酸基を選択的に転移する酵素を大量に得ることはヘパラン硫酸の構造解析研究において重要な手段を提供することになるので、当該酵素のcDNAのクローニングは非常に重要である。すなわち、本発明は当該酵素のポリペプチド及びその配列をコードするcDNAをクローニングすることにより、当該酵素を簡便な方法により大量入手する手段を提供し、それにより硫酸化多糖の構造-機能の関係の解明に寄与することを目的とする。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、ヘパラン硫酸やN,O-脱硫酸化再N-硫酸化ヘパリン（本明細書中において「CDSNS-ヘパリン」とも記載する）に含まれるL-イズロン酸残基の2位の水酸基に選択的に硫酸基を転移するグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素、すなわちヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素のポリペプチドをコードするDNAを鋭意検索し、該酵素のポリペプチドをコードする塩基配列を有するcDNAのクローニングに成功し、該cDNAによりヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素が発現することを確認して本発明を完成した。

【0007】すなわち本発明は、配列番号14に示すアミノ酸配列を有し、硫酸基供与体から硫酸基を、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれるL-イズロン酸残基の2位の水酸基に選択的に転移する酵素活性を実質的に害さない1つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入または転位を有していてもよいグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドの少なくとも一部をコードする塩基配列を有するDNAを提供する。

【0008】本発明のDNAとしては、配列番号14に示すアミノ酸配列の少なくとも一部をコードする塩基配列を有するDNAが挙げられ、より具体的には、配列番号2に示すアミノ酸配列の少なくとも一部及び配列番号4に示すアミノ酸配列の少なくとも一部をコードする塩基配列を有するDNAが挙げられる。

【0009】本発明は、また、以下の性質を有する硫酸基転移酵素のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを提供する。

①作用：硫酸基供与体から硫酸基を、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれるL-イズロン酸残基の2位の水酸基に選択的に転移する。

②基質特異性：ヘパラン硫酸およびCDSNS-ヘパリンには硫酸基を転移するが、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸およびケラタン硫酸には硫酸基を転移しない。

③至適反応pH:pH5.0~6.5付近

④至適反応イオン強度：50～200mM付近（塩化ナトリウムの場合）

⑤阻害及び活性化

プロタミンを共存させることにより酵素活性が増大する。アデノシン-3'，5'-ジリン酸（3'，5'-ADP）を共存させることにより酵素活性が阻害される。10mM以下のジチオスレイトール（DTT）を共存させることによってはほとんど酵素活性に影響を受けない。

⑥分子量：N-グリコシダーゼ処理後の非還元条件下でのSDS-ポリアクリラミドゲル電気泳動により推定される分子量：約38,000。

【0010】さらに、本発明は、上記DNAの塩基配列によってコードされるグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドの全部又は部分からなるポリペプチドを提供する。

【0011】また、さらに、本発明は、配列番号4に示すアミノ酸配列を有し、硫酸基供与体から硫酸基を、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれるL-イズロン酸残基の2位の水酸基に選択的に転移する酵素活性を実質的に害さない1つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を有していてもよいポリペプチドを含むグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素を提供する。

【0012】尚、本発明のDNAが有する塩基配列がコードするポリペプチドを含むグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素（以下「本酵素」とも記載する）を便宜的にヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素またはヘパラン硫酸2-O-スルホトランスフェラーゼと称するが、これは該酵素の基質がヘパラン硫酸に限られることを意味するものではない。例えば本酵素は、N, O-脱硫酸化したヘパリンを再度N-硫酸化することにより得られる化学修飾ヘパリン（N, O-脱硫酸化再N-硫酸化ヘパリンであり、本明細書中において「CDSNS-ヘパリン」とも記載する）に含まれるL-イズロン酸残基の2位の水酸基にも選択的に硫酸基を転移する。また、非修飾のヘパリンは、ほとんどのL-イズロン酸残基の2位に硫酸基を有しているが、わずかに水酸基を有するものがあり、本発明DNAが有する塩基配列がコードする酵素は、このようなヘパリンのL-イズロン酸残基の2位の水酸基にも硫酸基を選択的に転移する。本明細書においてはCDSNS-ヘパリンのような修飾ヘパリンも併せて、単にヘパリンと記載することがある。

【0013】また、本発明は、上記のDNAで形質転換された細胞を、好適な培地で培養し、該DNAが有する塩基配列によってコードされる本酵素のポリペプチドを培養物中に生成蓄積させ、その培養物から前記ポリペプチドを採取することを含む、ポリペプチドの製造方法を提供する。

【0014】

【発明の実施の形態】以下に、本発明の実施の形態を説

明する。

＜1＞本発明のグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA（本発明DNA）

本発明DNAは配列番号14に示すアミノ酸配列を有し、硫酸基供与体から硫酸基を、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれるL-イズロン酸残基の2位の水酸基に選択的に転移する酵素活性を実質的に害さない1つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入または転位を有していてもよいグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドの少なくとも一部をコードする塩基配列を有するDNAを提供する。

【0015】本発明DNAが有する塩基配列によってコードされるポリペプチドを含むグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素は、硫酸基供与体から、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれるL-イズロン酸残基の2位の水酸基に硫酸基を選択的に転移するヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素である。

【0016】本発明DNAは、本発明により初めて単離されたDNAであり、ヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素（以下「HS2ST」とも記載する）のポリペプチドの少なくとも一部をコードしているのであればその塩基配列は特に限定はされない。また、本発明DNAが有する塩基配列がコードするHS2STのポリペプチドは硫酸基供与体から硫酸基を、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれるL-イズロン酸残基の2位の水酸基に選択的に転移する活性を実質的に害さない1つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を有していてもよく、そのようなDNAのいずれもが本発明のDNAに包含される。該活性の測定方法は公知であり（例えば、J. Biol. Chem. 271, 7645-7653(1996)）、当業者であれば、目的とする酵素活性の有無を指標として、該活性を実質的に害さない1つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位をアミノ酸配列に有する本酵素を容易に選択することができる。

【0017】配列番号14に示すアミノ酸配列において、アミノ酸番号39は、好ましくは中性アミノ酸、より好ましくはセリン又はアラニンであり、アミノ酸番号67は、好ましくは中性アミノ酸、より好ましくはスレオニン又はアラニンであり、アミノ酸番号68は、好ましくは疎水性アミノ酸、より好ましくはロイシン又はバリンであり、アミノ酸番号74は、好ましくはメチオニン又はイソロイシンであり、アミノ酸番号100は、好ましくは塩基性アミノ酸、より好ましくは、リジン又はアルギニンであり、アミノ酸番号130は、好ましくは水酸基含有アミノ酸、より好ましくはセリン又はスレオニンであり、アミノ酸番号132は、好ましくはリジン又はアスパラギンであり、アミノ酸番号142は、好ましくは疎水性アミノ酸、より好ましくはバリン又はイソロイシンであり、アミノ酸番号277は、好ましくは酸

性アミノ酸、好ましくはグルタミン酸又はアスパラギン酸である。なお、ここで、塩基性アミノ酸とは、好ましくはヒスチジン、リジン及びアルギニンを意味し、酸性アミノ酸とは、好ましくはグルタミン酸及びアスパラギン酸を意味し、中性アミノ酸とは、酸性でも塩基性でもないアミノ酸即ち通常の生体環境で電荷を有さないアミノ酸、好ましくはグリシン、アラニン、セリン、スレオニンを意味し、疎水性アミノ酸とは、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、システイン及びこれらと同等の疎水性を有するアミノ酸、好ましくは、バリン、ロイシン及びイソロイシンを意味する。

【0018】上記本発明DNAにおいて、配列番号14に示すアミノ酸配列は、好ましくは配列番号2又は4に示すアミノ酸配列である。また、本発明DNAは、アミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を有さない配列番号14、2又は4に示すアミノ酸配列の少なくとも一部をコードする塩基配列をコードすることが好ましい。

【0019】本発明DNAとして具体的には、配列番号14に示すアミノ酸配列においてアミノ酸番号1～356で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAが挙げられ、より具体的には配列番号2においてアミノ酸番号1～356及び配列番号4においてアミノ酸番号1～356で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAが挙げられ、かつ好ましい。本発明DNAが有する塩基配列としてさらに具体的には、配列番号1及び配列番号3に示す塩基配列の少なくとも一部または全てを有するDNAが挙げられ、かつ特に好ましい。このようなDNAとして具体的には、配列番号1に示す塩基配列における塩基番号24～1091及び配列番号3に示す塩基配列における塩基番号355～1422の塩基配列を有するDNAが挙げられる。

【0020】配列番号1及び配列番号3に示す塩基配列において、HS2STcDNAのオープンリーディングフレームの5'末端部には4つのイン・フレームのATGコドンが含まれている。第1番目のATGコドンの周囲の塩基配列は、真核細胞の翻訳開始部位の共通配列と比較すると、-3の位置のプリンは保存されていないが、+4の位置のG(グアニン)が保存されている。このことは、効率的な翻訳には、-3の位置にプリンがないときは+4の位置のGが必須であるというKozakの知見(Kozak, M. (1986) Cell, 44, 283-292)を満足している。また、第2番目、第3番目、第4番目のATGコドンの周囲の塩基配列も、-3の位置がプリン(それぞれA(アデニン), A, G)であり、+4はGではなく、それぞれA, C(シトシン), Cであって共通配列に部分的に適合しており、いずれのATGコドンも開始コドンとして機能する可能性がある。しかしながら、第4番目のATGコドンはアミノ酸配列において膜貫通領域の疎水部位に当たるため、翻訳開始部位として機能する可能

性は低い。

【0021】ところで、 $\beta$ -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼは、フレーム内に2つのATGコドンを含むことが知られている(Nakazawa, K. et al. (1988) J. Biochem., 104, 165-168, Shaper, N. et al. (1988) J. Biol. Chem., 263, 10420-10428)。また、Shaperらは、 $\beta$ -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼは、2箇所からの翻訳開始の結果、長いものと短いものとの両方の形態が合成されることを示している。さらに、Lopezらは、長い形態のものは原形質膜を優先的に標的とし、短い形態のものは主としてゴルジ体内に存在することを示唆する証拠を示している(Lopez, L. et al. (1991) J. Biol. Chem., 266, 15984-15591)。同様に、HS2STについても、複数のATGコドンが開始コドンとして機能する可能性はあるが、定かではない。しかし、いずれのATGコドンが開始コドンであっても、上記の硫酸基転移酵素のポリペプチドをコードする点では同じであり、配列番号1及び配列番号3の塩基配列における第2番目、第3番目、第4番目のATGコドンから始まる塩基配列を有するDNAも本発明に包含されるものである。

【0022】配列番号1の最初のATGコドンで始まる单一のオープンリーディングフレームからは、356アミノ酸残基からなり、分子量41,830、N-結合グリコシレーション部位である可能性がある2カ所の部位を有するタンパク質が予測される。このアミノ酸配列から作成したハイドロバシープロット(図2)から、N-末端から14～27番目のアミノ酸残基にわたる長さ14残基の1つの顕著な疎水性部分が認められ、ransmenブレン(膜貫通)ドメインを有することが予想される。また、配列番号3の最初のATGコドンで始まる单一のオープンリーディングフレームからは、356アミノ酸残基からなり、分子量41,868、N-結合グリコシレーション部位である可能性がある2カ所の部位を有するタンパク質が予測される。このアミノ酸配列から作成したハイドロバシープロットから、N-末端から14～27番目のアミノ酸残基にわたる長さ14残基の1つの顕著な疎水性部分が認められ、ransmenブレン(膜貫通)ドメインを有することが予想される。

【0023】本発明DNAは、このDNAが有する塩基配列によってコードされるHS2STのポリペプチドが、硫酸基供与体から硫酸基を、硫酸基受容体であるヘパラン硫酸に含まれるL-イズロン酸残基の2位の水酸基に選択的に転移する活性を実質的に害されない限り、1つ又は2つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を起こすようなヌクレオチドの置換、欠失、挿入又は転位を有していてもよい。ヌクレオチドの置換、欠失、挿入又は転位は、両末端に制限酵素切断末端を持ち、変異点の両側を含む配列を合成し、未変異DNAが有する塩基配列の相当する部分と入れ換えることによ

り、DNAに導入することができる。また、部位特異的変異法 (Kramer, W. and Frits, H.J., Meth. in Enzymol., 154, 350(1987); Kunkel, T.A. et al., Meth. in Enzymol., 154, 367(1987))などの方法によつても、DNAに置換、欠失、挿入又は転位を導入することができる。本酵素の活性の測定方法は公知であり(例えば、J. Biol. Chem. 271, 7645-7653(1996))、当業者であれば、目的とする酵素活性の有無を指標として、該活性を実質的に害さない1つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位をアミノ酸配列に有する本酵素をコードするDNAにおける塩基配列の置換、欠失、挿入又は転位を容易に選択することができる。

【0024】なお、遺伝暗号の縮重による異なる塩基配列を有するDNAも本発明DNAに包含されることは、当業者であれば容易に理解されるところである。さらに、染色体由来のHS2ST遺伝子は、コード領域にイントロンを含むことが予想されるが、そのようなイントロンで分断されているDNA断片であつても、HS2STのポリペプチドの少なくとも一部をコードする限り、本発明のDNA断片に包含される。すなわち、本明細書において「コードする」とは、転写時にプロセッシングを受けて最終的に目的のポリペプチドを生じうる塩基配列を有することも包含する。

【0025】また、本明細書において「ポリペプチドの少なくとも一部をコードする」とは、好ましくは、HS2ST活性を有する、抗原性を有するなどの何らかの活性ないし機能を有する部分、あるいは、その部分に相当する塩基配列がそのHS2STに特異的であつて、プライマーやプローブとして使用できる部分をコードすることを意味する。

【0026】なお、本発明DNAには、本発明DNAに相補的なDNAまたはRNAも包含される。さらに本発明のDNAは、ヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素をコードするコード鎖のみの一本鎖であつてもよく、この一本鎖およびこれと相補的な配列を有するDNA鎖またはRNA鎖からなる二本鎖であつてもよい。

【0027】また、本発明DNAは、ヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素のポリペプチド全体をコードするコード領域全長の塩基配列を有していてもよく、またヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素のポリペプチドの一部分をコードする塩基配列を有するものであつてもよい。

【0028】特に、配列番号2に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素は、本発明者らによってチャイニーズハムスターの卵巣由来の培養細胞 (CHO細胞: ATCC CCL61) から精製されたヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素(Kobayashi, M., Habuchi, H., Habuchi, O., Saito, M., and Kimata, K. (1996) J. Biol. Chem. 271, 7645-7653)であり、下記のような理化学的性質を有する。

①作用：硫酸基供与体から、硫酸基受容体であるグリコ

サミノグリカンに含まれるL-イズロノ酸残基の2位の水酸基に硫酸基を選択的に転移する。すなわち、上記硫酸基受容体のL-イズロノ酸の2位水酸基以外には実質的に硫酸基を転移しない。硫酸基供与体としては活性硫酸(3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸；以下「PAPS」とも記載する)が好適には挙げられる。グルコサミン残基には実質的に硫酸基を転移しない。

②基質特異性：ヘパラン硫酸およびCDNS-ヘパリンには硫酸基を転移するが、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸およびケラタン硫酸には硫酸基を転移しない。

③至適反応pH：本酵素はpH5.0~6.5の範囲、特にpH5.5付近の反応液中で高い硫酸基転移活性を有する。

④至適反応イオン強度：本酵素の活性は反応イオン強度の増加にともなって増加し、NaClの場合、50~200mM、特に100mM付近で最も高い活性を示す。この範囲を超えてNaCl濃度が増加すると活性は徐々に低下し、500mMでは活性は極めて低くなる。

⑤阻害及び活性化

本酵素はプロタミンを反応液中に共存させることにより活性が増大する。約0.013mg/ml以上のプロタミンにより、プロタミン非存在下に比して約3倍に酵素活性が増大する。

【0029】また、本酵素の活性はアデノシン-3'，5'-ジリン酸(3', 5'-ADP)を反応液中に共存させることにより阻害される。尚、本酵素の活性は10mM以下のジチオスレイトール(DTT)を反応液中に共存させることによってはほとんど影響を受けない。

⑥分子量：N-アセチルグルコサミダーゼ(ジェンザイム(Genzyme)社製)処理後の非還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により推定される分子量：約38,000。

【0030】スーパーロース12(ファルマシア-LKB社製)ゲルクロマトグラフィーにより推定される分子量：約130,000。

⑦ミカエリス定数

硫酸基の受容体としてCDNS-ヘパリンを、硫酸基の供与体としてPAPSをそれぞれ用いたときの本酵素のPAPSに対するミカエリス定数(Km)は、約0.

20μMである。

【0031】このような性質を有する硫酸基転移酵素のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAも本発明DNAに包含されるものである。以下、本発明DNAを得る方法について説明する。本発明により本発明DNAが有する塩基配列によってコードされるアミノ酸配列が明らかにされたので、その配列に基づいて作成したオリゴヌクレオチドプライマーを用いるPCR法(ポリメラーゼ・チェイン・リアクション法)によって染色体DNAあるいはmRNAから本発明のDNAを增幅する

11

ことによって取得することも可能であり、また、特に、以下の各工程からなるcDNAクローニングにより製造することも可能である。

(1) 精製したヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素のペリペプチドの少なくとも一部のアミノ酸配列を決定する。

(2) 上記アミノ酸配列に基づいてオリゴヌクレオチドプライマーを作製する。

(3) 培養細胞より抽出したRNAから上記プライマーを用いてPCR法によりcDNAを增幅することによって前記硫酸基転移酵素のプローブを製造する。

(4) 上記プローブによって培養細胞又は生体組織由来のcDNAライブラリーをスクリーニングする。スクリーニングによって、通常には、上記硫酸基転移酵素の完全長cDNAを選択する。

【0032】しかし、本発明のDNAの製造方法はこれに限定されるものではなく、上記PCR法や、他の公知のcDNAクローニングの手法によっても本発明DNAを製造することができる。

【0033】以下に、本発明のDNAを製造する方法の一例を具体的に説明する。

(1) ヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素(HS2ST)のアミノ酸配列の決定

(i) HS2STの精製

ヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素は、チャイニーズハムスターの卵巣由来の培養細胞などへパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素を発現する細胞から、通常のタンパク質の精製方法、および通常のグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素の精製方法を組み合わせることによって精製することが可能である。具体的には、J. Biol. Chem. 271, (13), 7645-7653, (1996)に記載された方法に従って行うことができる。

【0034】(ii)ヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素の部分アミノ酸配列の決定

精製したHS2STには糖鎖が結合していることが知られているので、この糖鎖を除去するために精製HS2STをN-グリカナーゼなどの糖鎖分解酵素で消化し、脱グリコシル化されたHS2STをSDS-PAGE(SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)等で分離し、ポリビニリデンフルオリド(polyvinylidene fluoride; PVDF)膜やニトロセルロース膜などに転写する。この膜をクマシー・ブリリアント・ブルー(CBB)やアミドブラックなどのタンパク質を染色する色素で染色し、N-グリカナーゼ消化後に形成したタンパク質バンドを切り出して断片化に用いる。

【0035】断片化の方法は特に限定はされないが、上記タンパク質バンドにタンパク質分解酵素を接触させるなど、公知の方法でタンパク質を断片化することができる。具体的なタンパク質分解酵素の例としてはエンドプロテイナーゼLyse-C、エンドプロテイナーゼAsp

12

-Nなどが挙げられる。ゲルからバンドを切りだし、タンパク質分解酵素に接触させ、その後SDS-PAGEなどで分離してもよい。簡単な操作としては、Cleaveland, D. W., Fischer, S. G., Kirshner, M. W., and Laemmli, U. K. (1977) J. Biol. Chem. 252, 1102-1106の方法がある。すなわち、タンパク質バンドを切り出して別のゲルのウェルに挿入し、タンパク質分解酵素を含む緩衝液を、挿入したゲルに乗せてSDS-PAGEを行い、色素マーカーの先端が分離ゲルにはいる直前に電源を切ることによって泳動を一時中断し、約30分間酵素消化を行い、その後電気泳動を再開するという方法である。この方法によれば酵素消化と消化後のペプチド断片の分離が单一工程でできるため好ましい。断片化によって生じたペプチドをPVDF膜やニトロセルロース膜などに転写した後、CBBまたはアミドブラックなどを用いてペプチドを染色し、ペプチドのバンドを切り出す。タンパク質分解酵素消化後に生じたペプチドを含むPVDF膜やニトロセルロース膜などは、公知の方法でペプチドのアミノ末端配列決定を行うことが可能である。具体的にはモデル476Aプロテインシーケンサー(アプライドバイオシステムズ(Applied Biosystems)社製)などを用いてアミノ酸の配列を分析することが好ましいがこれに限定はされない。なお、業者に依頼してアミノ酸配列を決定してもらうことも可能である。

【0036】(iii)オリゴヌクレオチドプライマーの合成

HS2STの部分的アミノ酸配列に基づき、PCR用オリゴヌクレオチドプライマーを作成する。アミノ酸配列のうち、なるべくコドンの縮重が少ない部位を用いることが好ましい。このようなプライマーの例を、図1に示す(センスプライマー:配列番号8、9；アンチセンスプライマー:配列番号10、11)。

【0037】(2) HS2ST部分的cDNAの調製とプローブの作成

①全RNAは、公知の方法(Kingston, R. S., (1991) in Current Protocols in Molecular Biology, Suppl. 14, Unit 4.2, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New Yorkなど)で得ることができる。材料は、ヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素のm

RNAを発現している材料であれば限定はされないが、取り扱いの容易さ、および増殖可能な点で培養細胞が好ましい。培養細胞の中でも特にチャイニーズハムスターの卵巣細胞(CHO細胞:ATCC CCL61)が本酵素が強く発現し、酵素活性も比較的高いため好ましい。上記培養細胞の培養に用いる培地は特に制限されないが、大量の細胞を効率よく得るには、スピナーフラスコなどによる浮遊細胞の培養に適した物が好ましい。具体的にはCHO細胞を使用する場合には浮遊培養用のCHO-S-SFMII培地(ギブコ製)などの市販の培地を用いてもよい。上記のような培地を用いてスピナーフラスコを使

用して通常の培養細胞と同様にして培養すればよい。培養は、炭酸ガスインキュベーター中で行うことが好ましく、インキュベーター中の炭酸ガス濃度が5~7%、空気が95~93%となるように調整することが好ましい。また、温度は37~38°C程度に調整することが好ましい。

【0038】全RNAは、前述のように培養した培養細胞から通常用いられる全RNAの調製方法により得ることができるが、グアニジンチオシアネート/CsCl法(Kingston, R. E., (1991) in Current Protocols in Molecular Biology, Suppl. 14, Unit 4.2, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York)で調製することが好ましい。

#### 【0039】②ポリ(A)<sup>+</sup>RNAの調製

ポリ(A)<sup>+</sup>RNAは、上記のようにして得られた全RNAから、オリゴdT(oligo-(dT))セルロースカラムクロマトグラフィーなどによって精製することができる。

#### 【0040】③PCR法によるHS2ST部分的cDNAの増幅

上記ポリ(A)<sup>+</sup>RNAを錆型とし、オリゴヌクレオチドプライマーを用いた逆転写PCRにより、HS2ST部分的cDNAを増幅することができる。PCRは、通常の方法と同様にして行えばよいが、具体的方法を示すならば以下の通りである。1μlのポリ(A)<sup>+</sup>RNA、100pmolの前述のオリゴヌクレオチドプライマー、それぞれ500μMの4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸、200単位のM-MLV逆転写酵素(ギブコBRL(Gibco BRL))、1mMジチオスレイトール(DT T)、120単位のRNase(リボヌクレアーゼ)インヒビター(宝酒造(株)製)を含む緩衝液(終体積20μl)を37°Cで60分間インキュベートし、cDNA一次鎖を合成する。次に、上記の逆転写反応混合液2μl、1μMのオリゴヌクレオチドプライマー、それぞれ200μMの4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸、1.25単位のTaqポリメラーゼを含む反応液(終体積50μl)に対し、94°C1分、60°C2分、72°C2分を3サイクル行い、次いで60°C2分の工程の温度を3サイクルごとに2°Cずつ下げながら48°Cまで繰り返し、さらに48°Cで17サイクル繰り返して行う。

【0041】このようにして得られた部分的cDNAは、cDNAライブラリーから完全長cDNA(コード領域全長を含むcDNA)をスクリーニングするためのハイブリダイゼーションプローブとして用いられる。

#### 【0042】(3)cDNAライブラリーの作成

##### (i) cDNAの合成と組換えDNAの作成

cDNAは、ポリ(A)<sup>+</sup>RNAを錆型とした逆転写酵素反応により通常の方法を用いて合成することができる。合成する際は市販のcDNA合成用キットを用いるのが便利である。例えばTimeSaver cDNA syn

thesiskit(ファルマシアLKBバイオテクノロジー)を用いると、cDNAの合成およびcDNAをクローニングベクターに連結することもできる。また、市販のcDNAライブラリーを用いることにより、より簡便にcDNAを得ることも可能である。本発明においてもCHO細胞のcDNAライブラリーであるストラタジーン製のLambda ZAPライブラリー及びヒト胎児脳由来のcDNAライブラリーであるクロントック製のλgt11ライブラリーを用いている。クローニングベクターに結合した状態のこれらの組換えDNAを宿主細菌細胞中に導入(トランスフェクション)する。用いる宿主細菌細胞は、用いるクローニングベクターにより選択する必要があるが、通常は大腸菌(エシェリキア・コリ:Escherichia coli(E. coli))を宿主とするクローニングベクターと大腸菌との組み合わせが頻用されているがこれに限定はされない。トランスフェクションは通常、組換えDNAと30mM塩化カルシウムの存在下で細胞膜の透過性を変化させた大腸菌とを混合することにより行われる。Lambda ZAPやλgt11のような入ファージベクターの場合、組換えDNAを直接塩化カルシウム処理した大腸菌に導入もできるが、予め試験管中でファージ外殻に入れて(in vitroパッケージングという)、大腸菌に効率よく感染させる方法が一般に使用されており、市販されているパッケージング用のキット(Gigapack II packaging extract、ストラタジーン(Stratagene)製等)を用いてパッケージングを行うことも可能である。パッケージングした組換えDNAは、大腸菌にトランスフェクションするが、用いるクローニングベクターによって用いる大腸菌株を選択する必要がある。すなわち、抗生物質耐性遺伝子を含むクローニングベクターを用いる場合は、大腸菌に抗生物質に対する耐性の性質があつてはならず、また、β-ガラクトシダーゼ遺伝子(lacZ)等の遺伝子を含むクローニングベクターを用いる場合は、β-ガラクトシダーゼ活性を発現しない大腸菌を選択する必要がある。このことは、組換えDNAがトランスフェクションされた大腸菌をスクリーニングするために必要なことである。例えば、Lambda ZAPやλgt11クローニングベクターを用いる場合、E. coli XL-1 BlueやE. coli Y1088等の大腸菌株を選択すればよい。組換えDNAや組換えプラスミドが導入された大腸菌は抗生物質に対する耐性の獲得や、β-ガラクトシダーゼ活性の獲得等によりスクリーニングすることが可能である。具体的には、大腸菌を寒天培地にまき、生育したコロニーを選択すればよい。生育した大腸菌(組換えDNAがトランスフェクションされた大腸菌)は、cDNAライブラリーを構成する。プラスミドにブルースクリプトを用いた場合は、指示菌とともに軟寒天培地に懸濁し、寒天培地状に重層してプランクを形成させねばよい。DNA断片が挿入されたプラスミドを保持するファージプラ

15

ークは $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を発現しないので、容易に選択することができる。

【0043】(ii) HS2ST完全長cDNAクローニング

次に上記のようにして得られたcDNAライブラリーから、HS2ST完全長cDNAを有するファージクローンを、HS2ST部分的cDNAをプローブとしてハイブリダイゼーションにより選択することができる。ハイブリダイゼーションは、通常の方法に従って行えばよい。選択された陽性クローンから、ファージDNAを調製し、適当な制限酵素で切断することによりHS2ST cDNAを切り出すことができる。得られたcDNAは、そのまま、あるいは適当なプラスミドにサブクローニングして、塩基配列を決定する。

【0044】上記のようにして決定されたチャイニーズハムスター由来のHS2ST cDNAの塩基配列及びこの塩基配列から予想されるアミノ酸配列を配列番号1に、アミノ酸配列のみを配列番号2に示す。また、ヒト由来のHS2ST cDNAの塩基配列及びこの塩基配列から予想されるアミノ酸配列を配列番号3に、アミノ酸配列のみを配列番号4に示す。ヒト由来のHS2ST cDNAは、上記チャイニーズハムスター由来のHS2STをプローブとして使用し、ヒト由来のcDNAライブラリーをスクリーニングすることによっても得ることが可能である。

【0045】<2>本発明DNAの塩基配列によってコードされるグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドの全部又は部分からなるポリペプチド  
本発明は、上記の本発明DNAによってコードされるグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドの全部又は部分からなるポリペプチドも提供する。本明細書において、上記の「部分」とは、HS2ST活性を有する、抗原性を有するなどの何らかの活性ないし機能を有する部分を意味する。本ポリペプチドは単独であってもよいし、他のポリペプチドと融合していてもよい。本ポリペプチドは、糖鎖を有さないものであってもよい。

【0046】哺乳類の生体内で発現しているHS2STは糖鎖を有するため、糖鎖を有さない本ポリペプチドとは明確に区別される。このようなポリペプチドは、後記のポリペプチドの製造方法によって得ることができる。例えば、本発明を哺乳類の細胞に導入することにより、本ポリペプチドに糖鎖が付加されたものを製造することができ、また大腸菌などの原核生物の細胞に導入することにより糖鎖を有さないポリペプチドのみを製造することもできる。また、上記の活性ないし機能の有無を判定することは当業者に公知の方法によって行うことができる。

【0047】特に、配列番号4に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むHS2STは、ヒト組織で発現している新規なヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素で

10

20

30

40

50

16

あり、従って、本発明は、配列番号4に示すアミノ酸配列を有し、硫酸基供与体から硫酸基を、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれるL-イズロン酸残基の2位の水酸基に転移する酵素活性を実質的に害さない1つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を有していてもよいポリペプチドを含むグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素を提供する。

【0048】<3>本発明DNAを利用したHS2STポリペプチドの製造方法

上記本発明DNAで形質転換された細胞を、好適な培地で培養し、本発明DNAがコードするポリペプチドを培養物中に生成蓄積させ、その培養物から本発明ポリペプチドを採取することによって、HS2STのポリペプチドを製造することができる。

【0049】本発明DNAで形質転換された細胞は、公知の発現ベクターに本発明DNAの断片を挿入して組換えプラスミドを構築し、この組換えプラスミドを用いて形質転換を行うことによって得ることができる。細胞としては大腸菌等の原核細胞や、哺乳類細胞等の真核細胞が例示される。

【0050】本製造方法においては、タンパク質の製造に通常用いられる宿主-ベクター系を使用することができ、例えば、COS-7細胞等の哺乳類細胞とpCXN2(Niwa, H., Yamanura, K. and Miyazaki, J. (1991) Gene 108, 193-200)又はpFLAG(イーストマン コダック(Eastman Kodak)製)等の哺乳類細胞用発現ベクターの組み合わせを採用することが好ましい。培地や培養条件は、用いる宿主すなわち細胞に合わせて適宜選択される。

【0051】本発明DNAは直接発現させてもよいし、他のポリペプチドとの融合ポリペプチドとして発現させてもよい。また、本発明DNAは全長を発現させてもよいし、一部を部分ペプチドとして発現させてもよい。

【0052】培養物からの本発明ポリペプチドの採取は、公知のポリペプチドの精製方法によって行うことができる。なお培養物には、培地および当該培地中の細胞が含まれる。

【0053】

【実施例】以下に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

<1>チャイニーズハムスターのヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素の調製およびアミノ酸配列の分析

J. Biol. Chem. 271, 7645-7653(1996)に記載の方法により2回目の3', 5'-ADP-アガロースカラムからの溶出画分として部分精製したHS2STを得た。 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)を行るために、28μgのHS2STを10%トリクロロ酢酸により沈殿させ、アセトンで2回洗浄した。この沈殿は、5% (V/V) の2-メルカプトエタノールを含むローディングバッファーで100°C、3分間還元およ

17

び SDS 化した後、Laemmli (Laemmli, U. K. (1970) Nature 227, 680-685) の方法に従って 10% のポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGEを行った。SDS-PAGEで分離されたタンパク質を、10%メタノールを含有する pH 11 の 10 mM 3-シクロヘキシルアミノ-1-プロパンスルфон酸 (CAPS) 溶液中、200 mAで2時間30分、ProBlottのPVDF膜 (アプライドバイオシステム製) に転写した。転写したタンパク質を Aebersoldらの方法 (Aebersold, R.H., Leavitt, J., Saavedra, R.A., Hood, L.E., and Kent, S.B.H. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6970-6974) に従って Ponceau Sで染色した。45 kDa 以下の領域のバンドを切り出し、Iwamatsu の方法 (Iwamatsu, A. (1992) Electrophoresis 13, 142-147) を変更した方法によって PVDF膜上で変性させ S-カルボキシメチル化した。膜に転写されたタンパク質は、0.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 5% (V/V) アセトニトリル、1 mg ジチオスレイトール (DTT) を含む 8 M グアニジン塩酸塩溶液 300 μl 中で室温で 1 時間還元した。そこに 3 mg のヨード酢酸を含む 1 N NaOH 溶液 12 μl を加え、暗所に 15 分間置いた。この膜を蒸留水で洗浄し、その後 0.1% SDS を含有する 2% アセトニトリルで洗浄した。膜上の S-カルボキシメチル化したタンパク質は、1 mg のメチオニンを含む 100 mM の酢酸に溶解した 0.5% ポリビニルピロリジン (PVP-40) 300 μl 中で室温で 30 分間インキュベートし、10% (V/V) アセトニトリルで洗浄した。膜を細かく切断し、\*

18

\* 50 μl の Tris-HCl (pH 7.5) に溶解した 0.3 U の N-グリカナーゼで 37°C 15 時間処理した。その後、in situ 逐次的消化を、10% (V/V) アセトニトリルを含む pH 9.0 の 20 mM Tris-HCl 中に酵素: 基質 (mol:mol) が 1:50 となるように溶解したエンドプロテイナーゼ Lys-C により 37°C で 15 時間を行い、続いて 10% (V/V) アセトニトリルを含む pH 7.5 の 20 mM 炭酸水素アンモニウムと 25 mM CaCl<sub>2</sub> を含む pH 7.8 の反応液中に酵素: 基質 (mol:mol) が 1:50 となるように溶解したエンドプロテイナーゼ Asp-N により 40°C で 24 時間行うことにより行った。この消化産物を回収してフィルターにかけ、凍結乾燥した。1% (V/V) アセトニトリルを含む移動相 A (0.06% (V/V) トリフルオロ酢酸 (TFA)) 18 μl にこの凍結乾燥物を溶解し、逆相カラム (0.3 × 150 mm) でキャビラリー-HPLCを行った。ペプチドの溶出は流速 3.3 μl/min、100 分間で 2%~100%までの移動相 B (0.052% TFA を含む 80% アセトニトリル) の濃度勾配により行った。ペプチドの画分は 214 nm の吸光度をモニターしながら手作業で回収し、PVDF膜の小片にプロットした。アミノ酸配列決定はモデル 476 A プロテインシーカー (アプライドバイオシステムズ (Applied Biosystems)) で行った。表 1 に結果を示す。

## 【0054】

## 【表1】

ペプチド番号	アミノ酸配列	配列番号
1	DLCAKNRHYVLHI	5
2	DQYRFVKNI	6
3	DXYRPGLXR	7
4	DIVIXYNR	8
5	DLYR	9

## 【0055】&lt;2&gt;HS2ST部分 cDNA の PCRによる增幅

## (1) PCR用プライマーの作成

上記ペプチドの 1 と 2 に基づいて、図 1 に示すデオキシリノシン置換を有する末端および内部のプライマーの縮重オリゴヌクレオチドを作成した (鋳型 DNA 配列を持つプライマー 1 s (配列番号 10)、1 s i (配列番号 11)、鋳型の相補的配列を持つプライマー 2 a (配列番号 12)、2 a i (配列番号 13))。

## 【0056】(2) PCR反応

CHO細胞からオリゴdT (oligo-(dT)) セルロースクロマトグラフィーを使用する常法により採取したポリ(A)<sup>+</sup> RNA を逆転写反応の鋳型として、オリゴdT を約 50

※ ライマーとして cDNA の一本鎖を合成し、これを PCR の鋳型として使用した。PCR は、1 μM の末端プライマー 1 s と 2 a の混合物 (又は 1 s i と 2 a i)、2 μl の逆転写反応液、それぞれ 200 μM の 4 種類のデオキシヌクレオチド三リン酸、および 1.25 U の AmpliTaq ポリメラーゼ (パーキンエルマー (Perkin-Elmer) 製) を含む混合液 50 μl で行った。增幅は以下のように行った。はじめの 3 サイクルでは解離反応は 94°C で 1 分、アニーリングは 60°C で 2 分、伸長反応は 72°C で 2 分とし、3 サイクルごとに 50°C までアニーリングの温度のみを 2°Cずつ低くし、最終的にはアニーリングの温度が 48°C の条件で 17 サイクル行った。その後、さらに 15 分間伸長反応を行った。この操

19

作によって生じた増幅物質をアガロースゲル電気泳動により解析すると、増幅された約90 bpのDNAのバンドが検出された。1 sと2 aよりも3'末端よりにそれぞれ9 bpと3 bpシフトしているプライマー1 s iと2 s iを利用してPCRを行った結果でも、ほぼ同じ大きさのDNA断片が生じた。

【0057】<3>チャイニーズハムスターのHS2ST完全長cDNAの取得

(1) ハイブリダイゼーション用プローブの作成

1 sと2 aをプライマーとしてPCRを行って得られたDNA断片はJet sorb(ゲノメッド(Genomed)製)を使って回収した。T4 DNAポリメラーゼを使い平滑化し、T4ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化したこのDNAを、アルカリホスファターゼ処理をしたブルースクリプト(Bluescript)プラスミド(ストラタジーン(Stratogene)製)DNAのEcoRV消化断片と結合し、JM109を用いて、青と白の色による選択によりサブクローニングした。サブクローンは配列決定により確認した。

【0058】cDNAライブラリーのスクリーニングに使用した放射線ラベルしたプローブは、プライマー1 sおよび2 a、錫型としてサブクローニングされた約90 bpのDNA、ならびに( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)dCTP(アマシャム(Amersham)製)を含む最終量25  $\mu$ lの溶液で増幅したPCR産物から調製した。PCRは、94°Cで1分、48°Cで1分、72°Cで1分のサイクルを35回繰り返し、最終のサイクルではさらに72°Cでの伸長時間を15分延長することにより行った。

【0059】(2) HS2ST cDNAクローンのスクリーニング

CHO細胞のcDNAライブラリーであるLambda ZAP cDNAライブラリーをストラタジーンから購入した。宿主のE. coli XL-1 Blue細胞にライブラリーのファージを感染させた。プレート1枚当たり2~4×10<sup>4</sup>個のplaquesが形成されるようにまき、約1.4×10<sup>6</sup>個のコロニーをスクリーニングした。Uni-ZAP XRライブラリーから生じたコロニーを転写したHybond N+ナイロン膜をアルカリ固定法により固定し、37.5%ホルムアミド、5×SSPE(塩化ナトリウム/リン酸ナトリウム/EDTA緩衝液)、5×Denhard's solution、0.5% SDSと50  $\mu$ g/mlの変性させたサケ精子DNAを含む溶液中、45°Cで3.5時間プレハイブリダイズした。<sup>32</sup>Pラベルしたプローブを上記バッファー中に加え、42°Cで16時間ハイブリダイズした。フィルターを、55°Cで1×SSPE、1% SDS、さらに0.1×SSPE、0.1% SDSにより洗浄し、オートラジオグラフィーにより6個の陽性クローンを検出した。

【0060】(3) チャイニーズハムスター由来のHS2ST cDNAの塩基配列

20

陽性クローンからのブルースクリプトプラスミドを、ExAssistヘルパーファージとE. coli SOLRを使用するストラタジーンのin vivo DNA切り出し法(Stratagene in vivo excision protocol)により切り出した。SOLRに導入されたブルースクリプトプラスミドDNAをQIAGENプラスミドキットを用いて精製した。導入されたcDNAのうち、最も長い2.2 kb pのK3とH8と名付けたcDNAの塩基配列を決定した。塩基配列はdGTP/dCAGATPキットと同封のSequenaseバージョン2.0(それぞれU.S.バイオケミカル(Biochemical)製)を使用して確かめた。T3 DNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼによりDNA合成を開始し、約250 bpの位置に内部プライマーが挿入された。得られたDNAはコンピュータソフトウェアのジェネティックス-マック(GENE TYX-MAC:ソフトウェアデベロップメント社製)により編集、解析した。その結果、K3から得られたcDNAがH8から得られた全配列を含み、HS2STをコードする全領域を含むことが明らかになり、この配列からコードされたアミノ酸配列を予測した(配列番号1)。アミノ末端の配列に4つのイン・フレームのATGコドンが含まれた。最初のATGコドンの上流域-21の場所に終止コドンのTGA配列が存在した。最初のATGコドンから開始するオープンリーディングフレームは356アミノ酸残基の41,830 Daで2カ所の糖結合可能域を持つタンパク質が予想された。このアミノ酸配列のハイドロバシープロットにより、HS2STアミノ末端領域の14番目から27番目までの14アミノ酸残基が明確な疎水領域であることが判明した(図2)。塩基と予想されるアミノ酸配列を他のタンパク質をコードするDNAの塩基配列とタンパク質データベース(EMBL-GDBリリース44とNBRF-PDBリリース45)と比較した。その結果、ニワトリのコンドロイチン6-硫酸基転移酵素のアミノ酸番号179~183に存在するDLIYLの配列がアミノ酸番号338~342に保存されている以外は他の既知の硫酸基転移酵素と相同性は認められなかった。また、硫酸基転移酵素では比較的高い確率で保存されているアリル硫酸基転移酵素IVでPAPSと親和性を示すことが報告されているGXXGXXKまたはLEKGCRの配列(Zheng, Y., Bergold, A., and Duffel, M.W. (1994) J. Biol. Chem. 269, 30313-30319)も見いだせなかった。このアミノ酸配列から、精製したタンパク質をエンドプロテイナーゼAsp-Nで処理後、エンドプロテイナーゼLys-Cで処理して際に得られた断片のアミノ酸配列が全て見つかり、このcDNAクローンは精製されたHS2STをコードするものと決定された。

【0061】<4>ヒトのHS2ST完全長cDNAの取得

(1) HS2ST cDNAクローンのスクリーニング

21

上記チャイニーズハムスターのHS2ST cDNAをスクリーニング用プローブをとして使用してヒト由来のHS2ST完全長cDNAのスクリーニングを行った。ヒト胎児脳のcDNAライブラリーを組み込んだgt11 cDNAライブラリーをクロンテックから購入した。宿主のE. coli Y1088細胞にライブラリーのファージを感染させた。プレート1枚当たり2~4×10<sup>4</sup>個のplaquesが形成されるようにまき、約1.0×10<sup>6</sup>個のコロニーをスクリーニングした。gt11が組み込まれて生じたコロニーを転写したHyb o n d N+ナイロン膜をアルカリ固定法により固定し、3.7.5%ホルムアミド、5×SSPE(塩化ナトリウム/リン酸ナトリウム/EDTA緩衝液)、5×Denhard's solution、0.5% SDSと50μg/mlの変性させたサケ精子DNAを含む溶液中、42°Cで3.5時間プレハイブリダイズした。<sup>32</sup>Pラベルしたプローブを上記バッファー中に加え、42°Cで16時間ハイブリダイズした。フィルターを、45°Cで1×SSPE、1% SDS、さらに0.1×SSPE、0.1% SDSにより洗浄し、オートラジオグラフィーにより7個の陽性クローナーを検出した。

【0062】(2) HS2ST cDNAの塩基配列  
陽性クローナーからのブルースクリプトプラスミドを、ExAssistヘルパーファージとE. coli SOLRを使用するストラタジーンのin vivo DNA切り出し法(Stratagene in vivo excision protocol)により切り出した。SOLRに導入されたブルースクリプトプラスミドDNAをQIAGENプラスミドキットを用いて精製し、cDNAの塩基配列を決定した。塩基配列はdGTP/deazaGTPキットと同封のSequenaseバージョン2.0(それぞれU.S.バイオケミカル(Biochemical)製)を使用して確かめた。T3 DNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼによりDNA合成を開始した。得られたDNAはコンピュータソフトウェアのジェネティックスマック(GENETYX-MAC:ソフトウェアデベロップメント社製)により編集、解析した。その結果、ヒト由来のHS2STをコードする全領域の塩基配列が明らかになり、この配列からコードされたアミノ酸配列を予測した(配列番号3)。アミノ末端の配列に4つのイン・フレームのATGコドンが含まれた。最初のATGコドンの上流域-21の場所に終止コドンのTGA配列が存在した。最初のATGコドンから開始する\*

22

\*オープニングフレームは356アミノ酸残基の41868Daで2カ所の糖結合可能域を持つタンパク質が予想された。このアミノ酸配列のハイドロバシープロットにより、HS2STアミノ末端領域の14番目から27番目までの14アミノ酸残基が明確な疎水領域であることが判明した。塩基と予想されるアミノ酸配列を上記チャイニーズハムスター由来のcDNA及びそれがコードするHS2STと比較した。その結果、ヒト由来のHS2STはチャイニーズハムスター由来のHS2S

10 Tと97.5%の相同性を有することが明らかとなった(図3)。

#### 【0063】<5>HS2ST cDNAの発現

##### (1) HS2ST発現プラスミドの構築

HS2ST cDNAを発現させるために、発現ベクターにcDNA断片を挿入し、組換えプラスミドを構築した。単離したcDNAを哺乳動物の発現ベクターpcDNA3に導入した組換えプラスミドであるpcDNA3 HS2STを構築した。

##### 【0064】(2) COS-7細胞中でのHS2ST cDNAのトランジェント(一過性)な発現

HS2ST cDNAの発現の宿主にはCOS-7細胞を用いた。

【0065】pcDNA3 HS2STをトランスフェクトした細胞を67時間培養し、この細胞からKobayashi, M., Habuchi, H., Habuchi, O., Saito, M., and Kimata, K. (1996) J. Biol. Chem. 271, 7645-7653に記載の方法に従って細胞抽出液を調製した。この細胞抽出液を30分間4°C、10,000×gで遠心処理した後、上清画分のHS2ST、HS6ST、コンドロイチンO-硫酸基転移酵素(COST)活性を調べた。対照としてcDNAを含まないpcDNA3をトランスフェクトしたCOS-7細胞と何もトランスフェクトしないCOS-7細胞を用いた。単離したチャイニーズハムスター由来のcDNAを含むベクターをトランスフェクトすると、HS2ST活性は何もトランスフェクトしない対照の2.6倍に上がっていた(表2)。なお、これらの活性の測定はKobayashi, M., Habuchi, H., Habuchi, O., Saito, M., and Kimata, K. (1996) J. Biol. Chem. 271, 7645-7653に記載の方法に従って行った。

#### 【0066】

##### 【表2】

硫酸基転移酵素活性

	HS2ST	HS6ST	COST
対照	2.2±0.5	1.7±0.5	6.4±0.1
pcDNA3	2.2±0.1	1.9±0.3	6.7±0.5
pcDNA3HS2ST	5.7±0.7	1.6±0.4	7.0±0.1

\*表内の数値の単位はpmol/min/mg protein

【0067】表で示したように、上記で単離されたcDNAを発現させるベクターを保持する細胞のHS2ST活性は対照とcDNAを保持しないプラスミドを導入した細胞の約2.5倍であった。これに対してHS6ST活性およびCOST活性の増加は起らなかった。これらの結果から、単離されたcDNAがHS2ST活性を持つタンパク質をコードしていることが証明された。また、ヒト由来のHS2STのcDNAを用いて上記と同様にCOS-7細胞にトランスフェクションしてヒト由来のHS2STを発現させた。その結果、チャイニーズハムスターのHS2STを発現させた際と同様の結果が得られ、ヒト由来のHS2STのcDNAがチャイニーズハムスター由来のHS2STと同様の活性を有するHS2STをコードしていることが明らかとなった。

【0068】<6>チャイニーズハムスター卵巣細胞ポリ(A)<sup>+</sup>RNAのノザンプロットによるHS2ST発現の解析

チャイニーズハムスター卵巣由来培養細胞株CHOから抽出したポリ(A)<sup>+</sup>RNAをpH7.0の50%ホルムアミド(V/V)、6%ホルムアルデヒド(V/V)、20mM MOPSバッファーで65°C、10分間変性し、6%ホルムアルデヒド(V/V)を含む1.2%アガロースゲルで電気泳動を行った。50mMのNaOHで20分間処理した後、20×SSC(酢酸ナトリウム/塩化ナトリウム緩衝液)で45分間中和し、ゲル中のRNAをHybond N<sup>+</sup>ナイロン膜に一晩転写し、50mMのNaOHで5分間固定した。膜上に固定されたRNAを4°Cで3時間、50%ホルムアルデヒド、5×SSPE、5×Denhardt's solution、0.5%SDS、100μg/mlの変性させたサケ精子DNAを含む溶液中でプレハイブリダイズした。ハイブリダイズは<sup>32</sup>Pラベルしたプローブ(1×10<sup>6</sup>cpm/ml)を含む上記緩衝液で行った。放射線ラベルしたプローブはブルースクリプトに挿入されたK3クローンをSma IとAfa Iで消化して得られた配列番号1における塩基番号113~1,257間の1,145塩基からなるDNA断片から[α-<sup>32</sup>P]dCTPとReady-to-GO<sup>®</sup>o DNAラベリングキット(ファルマシアバイオテック(Pharmacia Biotech))を使用してランダムオリゴヌクレオチドープライムラベリング(Random oligonucleotide-prime labeling)法により作成した。この膜は65°Cで1×SSPE、0.1% SDSにより洗浄した\*

\*後、同温度で0.1×SSPE、0.1% SDSにより洗浄した。この膜を-80°Cで14時間、増感膜を用いてX線フィルムに感光させた。その結果、5.0kbと3.0kbの2つのバンドが得られた。

【0069】

【発明の効果】本発明により、ヘパラン硫酸に含まれるL-イズロノ酸残基の2位の水酸基に硫酸基を選択的に転移するヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素(HS2ST)のポリペプチド及びそれをコードする塩基配列を有するDNAが得られる。また更に該DNA由来のDNA断片から発現されるポリペプチドが得られる。

【0070】本発明により、HS2STのポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAが得られたので、HS2STを工業的に使用可能な程度まで大量生産できることが期待される。

【0071】

【配列表】

20 配列番号: 1  
配列の長さ: 2138  
配列の型: 核酸  
鎖の数: 両形態  
トポロジー: 直鎖状  
配列の種類: cDNA  
起源  
生物名: チャイニーズハムスター  
組織の種類: 卵巣  
配列の特徴  
30 特徴を表す記号: CDS  
存在位置: 24..1091  
特徴を決定した方法: P  
配列の特徴  
特徴を示す記号: transmembrane domain  
存在位置: 63..104  
特徴を決定した方法: P  
配列の特徴  
特徴を示す記号: potential N-glycosylation site  
存在位置: 345..353  
40 特徴を決定した方法: S  
配列の特徴  
特徴を示す記号: potential N-glycosylation site  
存在位置: 403..410  
特徴を決定した方法: S

配列

CTTGATCTCC AGCCGGGGT TTC ATG GGG CTC CTC AGG ATC ATG ATG CGG	50
Met Gly Leu Leu Arg Ile Met Met Pro	
1	5
CCC AAG TTG CAG CTG CTG GCG GTG GTG GCC TTC GCC GTG GCG ATG CTC	98
Pro Lys Leu Gln Leu Leu Ala Val Val Ala Phe Ala Val Ala Met Leu	

25				
10	15	20	25	
TTC TTG GAG AAC CAG ATC CAG AAG CTG GAG GAG TCC CGG GCG AAG CTA				146
Phe Leu Glu Asn Gln Ile Gln Lys Leu Glu Glu Ser Arg Ala Lys Leu				
30	35	40		
GAA AGG GCA ATC GCA AGA CAT GAA GTC CGG GAA ATT GAA CAG CGG CAT				194
Glu Arg Ala Ile Ala Arg His Glu Val Arg Glu Ile Glu Gln Arg His				
45	50	55		
ACA ATG GAT GGC CCT CGG CAA GAT GCG GCT GTA GAT GAA GAA GAA GAT				242
Thr Met Asp Gly Pro Arg Gln Asp Ala Ala Val Asp Glu Glu Glu Asp				
60	65	70		
ATA GTC ATC ATT TAT AAC AGA GTT CCC AAA ACT GCA AGC ACC TCG TTT				290
Ile Val Ile Ile Tyr Asn Arg Val Pro Lys Thr Ala Ser Thr Ser Phe				
75	80	85		
ACC AAT ATC GCC TAT GAC TTG TGT GCG AAG AAT AGA TAC CAT GTT CTT				338
Thr Asn Ile Ala Tyr Asp Leu Cys Ala Lys Asn Arg Tyr His Val Leu				
90	95	100	105	
CAC ATC AAC ACT ACC AAA AAC AAC CCA GTG ATG TCA TTG CAA GAT CAG				386
His Ile Asn Thr Thr Lys Asn Asn Pro Val Met Ser Leu Gln Asp Gln				
110	115	120		
GTA CGC TTT GTA AAG AAT ATA ACC ACT TGG AAC GAG ATG AAA CCA GGG				434
Val Arg Phe Val Lys Asn Ile Thr Thr Trp Asn Glu Met Lys Pro Gly				
125	130	135		
TTT TAT CAT GGA CAC ATT TCT TAT CTG GAT TTT GCA AAA TTC GGT GTG				482
Phe Tyr His His Ile Ser Tyr Leu Asp Phe Ala Lys Phe Gly Val				
140	145	150		
AAG AAG AAG CCC ATT TAC ATT AAT GTC ATC AGG GAC CCT ATC GAG AGG				530
Lys Lys Lys Pro Ile Tyr Ile Asn Val Ile Arg Asp Pro Ile Glu Arg				
155	160	165		
CTT GTT TCC TAC TAT TAC TTT CTG AGG TTT GGG GAT GAT TAC AGA CCA				578
Leu Val Ser Tyr Tyr Phe Leu Arg Phe Gly Asp Asp Tyr Arg Pro				
170	175	180	185	
GGA TTA AGG AGA CGG AAA CAA GGA GAC AAA AAG ACC TTT GAT GAA TGT				626
Gly Leu Arg Arg Arg Lys Gln Gly Asp Lys Lys Thr Phe Asp Glu Cys				
190	195	200		
GTG GCT GAG GGC GGC TCA GAC TGT GCT CCG GAG AAG CTC TGG CTC CAG				674
Val Ala Glu Gly Gly Ser Asp Cys Ala Pro Glu Lys Leu Trp Leu Gln				
205	210	215		
ATC CCA TTT TTC TGT GGC CAC AGC TCA GAA TGC TGG AAT GTG GGA AGC				722
Ile Pro Phe Phe Cys Gly His Ser Ser Glu Cys Trp Asn Val Gly Ser				
220	225	230		
AGA TGG GCT ATG GAT CAA GCT AAG TAT AAC CTC ATT AAC GAG TAC TTT				770
Arg Trp Ala Met Asp Gln Ala Lys Tyr Asn Leu Ile Asn Glu Tyr Phe				
235	240	245		
CTG GTG GGA GTT ACT GAG GAG CTG GAA GAC TTC ATC ATG CTA CTC GAG				818
Leu Val Gly Val Thr Glu Glu Leu Glu Asp Phe Ile Met Leu Leu Glu				
250	255	260	265	
GCA GCT TTG CCC CGG TTT TTC CGG GGT GCT ACA GAC CTC TAT CGT ACA				866
Ala Ala Leu Pro Arg Phe Phe Arg Gly Ala Thr Asp Leu Tyr Arg Thr				
270	275	280		
GGA AAG AAA TCC CAC CTG AGG AAA ACC ACA GAG AAG AAA CTT CCC ACC				914

27

Gly Lys Lys Ser His Leu Arg Lys Thr Thr Glu Lys Lys Leu Pro Thr		
285	290	295
AAG CAA ACC ATC GCG AAG CTG CAG CAG TCT GAC ATT TGG AAA ATG GAA		962
Lys Gln Thr Ile Ala Lys Leu Gln Gln Ser Asp Ile Trp Lys Met Glu		
300	305	310
AAT GAG TTC TAC GAG TTT GCA CTA GAG CAG TTC CAG TTC ATC AGA GCC		1010
Asn Glu Phe Tyr Glu Phe Ala Leu Glu Gln Phe Gln Phe Ile Arg Ala		
315	320	325
CAC GCT GTC CGT GAG AAA GAT GGA GAC CTC TAC ATC CTG GCC CAG AAC		1058
His Ala Val Arg Glu Lys Asp Gly Asp Leu Tyr Ile Leu Ala Gln Asn		
330	335	340
345		
TTT TTC TAT GAA AAG ATT TAC CCG AAG TCG AAC TGAGTGGAG TGAGTGGAGA		1111
Phe Phe Tyr Glu Lys Ile Tyr Pro Lys Ser Asn		
350	355	
GCAGTCTTGA ACCTGGACTT GGCTGTGTTG TCACCGTTGT TCTCAGCTTC TGACACCTTT		1171
CTGCTAATCG AGTCCAAGCC GAGCCAGTTC TTGTTGGGCC GAGTTGGGG ACGACACAGGA		1231
GTGTCAGAAA ATTAGATGCT GAATGGGATG TCAGTGTCT AAGGAGTTCT TAAGTTCTTA		1291
AGTGTGATGA ATTGTTATTCTTGTGTTAC TTGTTTTCA TTTTGTGAT AGCTATAATC		1351
TCCCAGTGAG GAGAAATCTC ATGTCACCTTA AAATACACAC ATGGAGGTTT AATCAGAAGG		1411
CTGAATACCA TTTCAAGAAGA GGTTCTGTGA TTCTCTGCT TTTGATGAAG CATTGTTATC		1471
ACCTCTTT GGATGCGAT GAGTGTGAT GGCACCTGGA GTTTGTGTT GCACACCCCT		1531
ACTGGATAGT GCTAATAACT ATTTGCCAGT AGCTGATTTG TTATGTTGGA TCACGTCTCA		1591
CAGAGTTAT TGGATGTTT GATCATGTTT TCTCAGAACT GTTTTGCTG TAGTTGAGTT		1651
TGCCCATATT TATGTTAGCT TTATTTATT TTTGGATGA TCATTAGTGT TAAAGAAATC		1711
AACTGAAAAC CATGAATAAT ACTGTAAAAA GACAAACAG TTAAAGCAG TATTCTGTAT		1771
TTCTGTCTCC CCAGTATCTA ATATGGGT GGTATTTCTA AGAATGTTGA CAACATTATC		1831
TGAGGCTTTC TAAAGGATT CCACACATTC ATATAAAAAA AATGAGTTA GTATTTGTTT		1891
CTCCATGGCT TCTCTATAAC CCAGTACACT GAAGTATCGG TGACTGCATA TGCAACTCC		1951
ATCAGTGAGC TGTGATGGTA GGATTTCTC ACCTCTGTAC TTTTACCTGT AGACTATTTT		2011
TACTACGGTG CTTTATAATG TGTTTAAAG CATTGCATT ACAAAAGAAA AATGCTGTAA		2071
ATATTGCATA TTTTATGTAT TTGGACCAAAG AAGTTACAAG TCAGTAGATA AAAAGTGGTT		2131
TTGCACC		2138

【0072】配列番号：2

\* トポロジー：直鎖状

配列の長さ：356

配列の種類：タンパク質

配列の型：アミノ酸

\*

配列

Met Gly Leu Leu Arg Ile Met Met Pro Pro Lys Leu Gln Leu Leu Ala		
1	5	10
Val Val Ala Phe Ala Val Ala Met Leu Phe Leu Glu Asn Gln Ile Gln		15
20	25	30
Lys Leu Glu Glu Ser Arg Ala Lys Leu Glu Arg Ala Ile Ala Arg His		
35	40	45
Glu Val Arg Glu Ile Glu Gln Arg His Thr Met Asp Gly Pro Arg Gln		
50	55	60
Asp Ala Ala Val Asp Glu Glu Asp Ile Val Ile Ile Tyr Asn Arg		
65	70	75
Val Pro Lys Thr Ala Ser Thr Ser Phe Thr Asn Ile Ala Tyr Asp Leu		80
85	90	95
Cys Ala Lys Asn Arg Tyr His Val Leu His Ile Asn Thr Thr Lys Asn		
100	105	110

2 9

3 0

Asn Pro Val Met Ser Leu Gln Asp Gln Val Arg Phe Val Lys Asn Ile  
 115 120 125  
 Thr Thr Trp Asn Glu Met Lys Pro Gly Phe Tyr His Gly His Ile Ser  
 130 135 140  
 Tyr Leu Asp Phe Ala Lys Phe Gly Val Lys Lys Pro Ile Tyr Ile  
 145 150 155 160  
 Asn Val Ile Arg Asp Pro Ile Glu Arg Leu Val Ser Tyr Tyr Tyr Phe  
 165 170 175  
 Leu Arg Phe Gly Asp Asp Tyr Arg Pro Gly Leu Arg Arg Arg Lys Gln  
 180 185 190  
 Gly Asp Lys Lys Thr Phe Asp Glu Cys Val Ala Glu Gly Gly Ser Asp  
 195 200 205  
 Cys Ala Pro Glu Lys Leu Trp Leu Gln Ile Pro Phe Phe Cys Gly His  
 210 215 220  
 Ser Ser Glu Cys Trp Asn Val Gly Ser Arg Trp Ala Met Asp Gln Ala  
 225 230 235 240  
 Lys Tyr Asn Leu Ile Asn Glu Tyr Phe Leu Val Gly Val Thr Glu Glu  
 245 250 255  
 Leu Glu Asp Phe Ile Met Leu Leu Glu Ala Ala Leu Pro Arg Phe Phe  
 260 265 270  
 Arg Gly Ala Thr Asp Leu Tyr Arg Thr Gly Lys Ser His Leu Arg  
 275 280 285  
 Lys Thr Thr Glu Lys Lys Leu Pro Thr Lys Gln Thr Ile Ala Lys Leu  
 290 295 300  
 Gln Gln Ser Asp Ile Trp Lys Met Glu Asn Glu Phe Tyr Glu Phe Ala  
 305 310 315 320  
 Leu Glu Gln Phe Gln Phe Ile Arg Ala His Ala Val Arg Glu Lys Asp  
 325 330 335  
 Gly Asp Leu Tyr Ile Leu Ala Gln Asn Phe Phe Tyr Glu Lys Ile Tyr  
 340 345 350  
 Pro Lys Ser Asn  
 355

【0073】配列番号：3

配列の長さ：2172

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：ヒト

組織の種類：胎児脳

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：355..1422

特徴を決定した方法：P

\* 配列の特徴

特徴を示す記号：transmembrane domain

存在位置：394..435

特徴を決定した方法：P

配列の特徴

特徴を示す記号：potential N-glycosylation site

存在位置：676..684

40 特徴を決定した方法：S

配列の特徴

特徴を示す記号：potential N-glycosylation site

存在位置：733..741

特徴を決定した方法：S

\*

配列

GGGAAGGAAG GAAGAGAGGG AGGCCGGCAA GCAGGCGGGC GCGGGGGTCG GAGACTGAGG	60
CACTAGAGGG AGGCCAGAGC CCGGCAGCCG CTTCGCGCTG TTTGCTGGCG CGGGTTTTGG	120
AGGGGGCGGC CGTTTAGTOG GCTGAGGAGA AGCGGACACC AGCGGCGTTG GTGATAGCGC	180
CTGGGGGAGG GGGACTGGAG AGGCAGAGAG GGGGGTTCGC TGCGGTGGTT CTCTCGCTGT	240

31

CGCTCTCTCT TTGCCTCGCT CCCGGCTCGG CGGGCTCCTC CGGGCGTCTC TCTCGCCTCC	300
GGGGTCCCGC TCCCCCCCCC CCGCGGTATG TCTTGATCCC GAGCAGCGGG TTTC ATG	357
Met	
1	
GGG CTC CTC AGG ATT ATG ATG CCG CCC AAG TTG CAG CTG CTG GCG GTG	405
Gly Leu Leu Arg Ile Met Met Pro Pro Lys Leu Gln Leu Leu Ala Val	
5 10 15	
GTG GCC TTC GCG GTG GCG ATG CTC TTC TTG GAA AAC CAG ATC CAG AAA	453
Val Ala Phe Ala Val Ala Met Leu Phe Leu Glu Asn Gln Ile Gln Lys	
20 25 30	
CTG GAG GAG TCC CGC TCG AAG CTA GAA AGG GCT ATT GCA AGA CAC GAA	501
Leu Glu Glu Ser Arg Ser Lys Leu Glu Arg Ala Ile Ala Arg His Glu	
35 40 45	
GTC CGA GAA ATT GAG CAG CGA CAT ACA ATG GAT GGC CCT CGG CAA GAT	549
Val Arg Glu Ile Glu Gln Arg His Thr Met Asp Gly Pro Arg Gln Asp	
50 55 60 65	
GCC ACT TTA GAT GAG GAA GAG GAC ATG GTG ATC ATT TAT AAC AGA GTT	597
Ala Thr Leu Asp Glu Glu Glu Asp Met Val Ile Ile Tyr Asn Arg Val	
70 75 80	
CCC AAA ACG GCA AGC ACT TCA TTT ACC AAT ATC GCC TAT GAC CTG TGT	645
Pro Lys Thr Ala Ser Thr Ser Phe Thr Asn Ile Ala Tyr Asp Leu Cys	
85 90 95	
GCA AAG AAT AAA TAC CAT GTC CTT CAT ATC AAC ACT ACC AAA AAT AAT	693
Ala Lys Asn Lys Tyr His Val Leu His Ile Asn Thr Thr Lys Asn Asn	
100 105 110	
CCA GTG ATG TCA TTG CAA GAT CAG GTG CGC TTT GTA AAG AAT ATA ACT	741
Pro Val Met Ser Leu Gln Asp Gln Val Arg Phe Val Lys Asn Ile Thr	
115 120 125	
TCC TGG AAA GAG ATG AAA CCA GGA TTT TAT CAT GGA CAC GTT TCT TAC	789
Ser Trp Lys Glu Met Lys Pro Gly Phe Tyr His Gly His Val Ser Tyr	
130 135 140 145	
TTG GAT TTT GCA AAA TTT GGT GTG AAG AAG AAA CCA ATT TAC ATT AAT	837
Leu Asp Phe Ala Lys Phe Gly Val Lys Lys Pro Ile Tyr Ile Asn	
150 155 160	
GTC ATA AGG GAT CCT ATT GAG AGG CTA GTT TCT TAT TAC TTT CTG	885
Val Ile Arg Asp Pro Ile Glu Arg Leu Val Ser Tyr Tyr Tyr Phe Leu	
165 170 175	
AGA TTT GGA GAT GAT TAT AGA CCA GGG TTA CGG AGA CGA AAA CAA GGA	933
Arg Phe Gly Asp Asp Tyr Arg Pro Gly Leu Arg Arg Arg Lys Gln Gly	
180 185 190	
GAC AAA AAG ACC TTT GAT GAA TGT GTA GCA GAA GGT GGC TCA GAC TGT	981
Asp Lys Lys Thr Phe Asp Glu Cys Val Ala Glu Gly Gly Ser Asp Cys	
195 200 205	
GCT CCA GAG AAG CTC TGG CTT CAA ATC CCG TTC TTC TGT GGC CAT AGC	1029
Ala Pro Glu Lys Leu Trp Leu Gln Ile Pro Phe Phe Cys Gly His Ser	
210 215 220 225	
TCC GAA TGC TGG AAT GTG GGA AGC AGG TGG GCT ATG GAT CAA GCC AAG	1077
Ser Glu Cys Trp Asn Val Gly Ser Arg Trp Ala Met Asp Gln Ala Lys	
230 235 240	
TAT AAC CTA ATT AAT GAA TAT TTT CTG GTG GGA GTT ACT GAA GAA CTT	1125

33

34

Tyr Asn Leu Ile Asn Glu Tyr Phe Leu Val Gly Val Thr Glu Glu Leu			
245	250	255	
GAA GAT TTT ATC ATG TTA TTG GAG GCA GCA TTG CCC CGG TTT TTC AGG			1173
Glu Asp Phe Ile Met Leu Leu Glu Ala Ala Leu Pro Arg Phe Phe Arg			
260	265	270	
GGT GCT ACT GAA CTC TAT CGC ACA GGA AAG AAA TCT CAT CTT AGG AAA			1221
Gly Ala Thr Glu Leu Tyr Arg Thr Gly Lys Lys Ser His Leu Arg Lys			
275	280	285	
ACC ACA GAG AAG AAA CTC CCC ACT AAA CAA ACC ATT GCA AAA CTA CAG			1269
Thr Thr Glu Lys Leu Pro Thr Lys Gln Thr Ile Ala Lys Leu Gln			
290	295	300	305
CAA TCT GAT ATT TGG AAA ATG GAG AAT GAG TTC TAT GAA TTT GCA CTA			1317
Gln Ser Asp Ile Trp Lys Met Glu Asn Glu Phe Tyr Glu Phe Ala Leu			
310	315	320	
GAG CAG TTC CAA TTC ATC AGA GCC CAT GCC GTT CGA GAA AAA GAT GGA			1365
Glu Gln Phe Gln Phe Ile Arg Ala His Ala Val Arg Glu Lys Asp Gly			
325	330	335	
GAC CTC TAC ATC CTC GCA CAA AAC TTT TTC TAT GAA AAG ATT TAC CCT			1413
Asp Leu Tyr Ile Leu Ala Gln Asn Phe Phe Tyr Glu Lys Ile Tyr Pro			
340	345	350	
AAG TCG AAC TGAGTATAAG GTGTGACTAT TAGATTCTTG AACTAAAATT			1462
Lys Ser Asn			
355			
TGACCCCTGTC TTCACCTTG TTCTCAGCTC CACAGCTGG ATTGCTGACA GTAGGTGTAT			1522
ATGACAATTT GTATTGAGCC AAATTAGGAA ACAGACAGTA ACGTCAAGGA AGTAGATACT			1582
GGCTGGCATTT GTCAGTGTTC TAAGTTTCAG GCATTTTAT TTTTCTCTGG CTAAACGTTG			1642
GTGAAAGTTA TAACCTCCTG CCTGGGAGAA AATATACATC ACCTAAAATG AACTTATGGC			1702
AGGTCTAAC TAAAGGCTAA ATACAATTTC AGAAAAGGTT CTGATACTCT TGTGTTTGAT			1762
AAAGCATTTC TTCAACTAAC CATGAATTAA GATGAGTCCA TTTGCCTCTT CTGCCTTCAC			1822
TGAGGGTTTG GGTTTACAC CTCTACTGAA TTGTGTTAAT AACTGTTGG CAGTGTGTAC			1882
TTTGTGTTTG TGAGTCATGT CTCATGAAAT TTATTGGAAT GTTTAATCAT ATTTGCTAAG			1942
AAATGTTCT GCTGTAGTTG GATTTGCCCA TATTTATGTA GGTGGTTTA ATTTTTAAA			2002
TGTTGATTAG TGTTAAAAAT CAATTTAAAT CATGACTAAT ATGGAAAAA GATAAAGCAT			2062
CAAAGCAGTA TTTCTCATTC CTGCCCTCTC AATATCTAAT ACTGGGAAGA TACTTCAAAG			2122
AATATTGAGA TTGCTGAAG TTTAGTTAA GATTTTCACA CATTAAATATC			2172

【0074】配列番号：4

\* トポロジー：直鎖状

配列の長さ：356

配列の種類：タンパク質

配列の型：アミノ酸

\*

配列

Met Gly Leu Leu Arg Ile Met Met Pro Pro Lys Leu Gln Leu Leu Ala  
 1 5 10 15  
 Val Val Ala Phe Ala Val Ala Met Leu Phe Leu Glu Asn Gln Ile Gln  
 20 25 30  
 Lys Leu Glu Glu Ser Arg Ser Lys Leu Glu Arg Ala Ile Ala Arg His  
 35 40 45  
 Glu Val Arg Glu Ile Glu Gln Arg His Thr Met Asp Gly Pro Arg Gln  
 50 55 60  
 Asp Ala Thr Leu Asp Glu Glu Asp Met Val Ile Ile Tyr Asn Arg  
 65 70 75 80  
 Val Pro Lys Thr Ala Ser Thr Ser Phe Thr Asn Ile Ala Tyr Asp Leu

35

36

85	90	95
Cys Ala Lys Asn Lys Tyr His Val Leu His Ile Asn Thr Thr Lys Asn		
100	105	110
Asn Pro Val Met Ser Leu Gln Asp Gln Val Arg Phe Val Lys Asn Ile		
115	120	125
Thr Ser Trp Lys Glu Met Lys Pro Gly Phe Tyr His Gly His Val Ser		
130	135	140
Tyr Leu Asp Phe Ala Lys Phe Gly Val Lys Lys Pro Ile Tyr Ile		
145	150	155
Asn Val Ile Arg Asp Pro Ile Glu Arg Leu Val Ser Tyr Tyr Tyr Phe		
165	170	175
Leu Arg Phe Gly Asp Asp Tyr Arg Pro Gly Leu Arg Arg Arg Lys Gln		
180	185	190
Gly Asp Lys Lys Thr Phe Asp Glu Cys Val Ala Glu Gly Ser Asp		
195	200	205
Cys Ala Pro Glu Lys Leu Trp Leu Gln Ile Pro Phe Phe Cys Gly His		
210	215	220
Ser Ser Glu Cys Trp Asn Val Gly Ser Arg Trp Ala Met Asp Gln Ala		
225	230	235
Lys Tyr Asn Leu Ile Asn Glu Tyr Phe Leu Val Gly Val Thr Glu Glu		
245	250	255
Leu Glu Asp Phe Ile Met Leu Leu Glu Ala Ala Leu Pro Arg Phe Phe		
260	265	270
Arg Gly Ala Thr Glu Leu Tyr Arg Thr Gly Lys Ser His Leu Arg		
275	280	285
Lys Thr Thr Glu Lys Lys Leu Pro Thr Lys Gln Thr Ile Ala Lys Leu		
290	295	300
Gln Gln Ser Asp Ile Trp Lys Met Glu Asn Glu Phe Tyr Glu Phe Ala		
305	310	315
Leu Glu Gln Phe Gln Phe Ile Arg Ala His Ala Val Arg Glu Lys Asp		
325	330	335
Gly Asp Leu Tyr Ile Leu Ala Gln Asn Phe Phe Tyr Glu Lys Ile Tyr		
340	345	350
Pro Lys Ser Asn		
355		

【0075】配列番号：5

\* トポロジー：一本鎖

配列の長さ：13

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

\*

配列

Asp Leu Cys Ala Lys Asn Arg Tyr His Val Leu His Ile

1

5

10

【0076】配列番号：6

※配列の長さ：9

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

配列の型：アミノ酸

トポロジー：一本鎖

トポロジー：一本鎖

配列の種類：ペプチド

配列の種類：ペプチド

配列

Asp Xaa Tyr Arg Pro Gly Leu Xaa Arg

1

5

Asp Gln Val Arg Phe Val Lys Asn Ile

【0078】配列番号：8

1

5

【0077】配列番号：7

※50 配列の長さ：8

37

配列の型：アミノ酸  
 トポロジー：一本鎖  
 配列の種類：ペプチド  
 配列  
 Asp Ile Val Ile Xaa Tyr Asn Arg  
 1 5  
 【0079】配列番号：9  
 配列の長さ：4  
 配列の型：アミノ酸  
 トポロジー：一本鎖

\*配列の種類：ペプチド  
 配列  
 Asp Leu Tyr Arg  
 1  
 【0080】配列番号：10  
 配列の長さ：20  
 配列の型：核酸  
 トポロジー：直鎖状  
 鎮の数：一本鎖  
 \*10 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列  
 GCNAARAAYM GNTAYCAYGT  
 【0081】配列番号：11  
 配列の長さ：20  
 配列の型：核酸  
 配列  
 MGN TAYCAYG TNYTNCAYAT

20  
 ※トポロジー：直鎖状  
 鎮の数：一本鎖  
 ※ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

【0082】配列番号：12  
 配列の長さ：20  
 配列の型：核酸  
 配列  
 TTYTTNACRA ANCKNACYTG  
 【0083】配列番号：13  
 配列の長さ：20  
 配列の型：核酸  
 配列  
 TTNACRAANC KNACYTGRTC

★トポロジー：直鎖状  
 鎮の数：一本鎖  
 ★20 配列の種類：他の核酸 合成DNA  
 ☆トポロジー：直鎖状  
 鎮の数：一本鎖  
 ☆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

【0084】配列番号：14  
 配列の長さ：356  
 配列の型：アミノ酸  
 配列  
 Met Gly Leu Leu Arg Ile Met Met Pro Pro Lys Leu Gln Leu Ala  
 1 5 10 15  
 Val Val Ala Phe Ala Val Ala Met Leu Phe Leu Glu Asn Gln Ile Gln  
 20 25 30  
 Lys Leu Glu Glu Ser Arg Xaa Lys Leu Glu Arg Ala Ile Ala Arg His  
 35 40 45  
 Glu Val Arg Glu Ile Glu Gln Arg His Thr Met Asp Gly Pro Arg Gln  
 50 55 60  
 Asp Ala Xaa Xaa Asp Glu Glu Asp Xaa Val Ile Ile Tyr Asn Arg  
 65 70 75 80  
 Val Pro Lys Thr Ala Ser Thr Ser Phe Thr Asn Ile Ala Tyr Asp Leu  
 85 90 95  
 Cys Ala Lys Xaa Arg Tyr His Val Leu His Ile Asn Thr Thr Lys Asn  
 100 105 110  
 Asn Pro Val Met Ser Leu Gln Asp Gln Val Arg Phe Val Lys Asn Ile  
 115 120 125  
 Thr Xaa Trp Xaa Glu Met Lys Pro Gly Phe Tyr His Gly His Xaa Ser  
 130 135 140  
 Tyr Leu Asp Phe Ala Lys Phe Gly Val Lys Lys Pro Ile Tyr Ile

38

39			40
145	150	155	160
Asn Val Ile Arg Asp Pro Ile Glu Arg Leu Val Ser Tyr Tyr Tyr Phe			
165		170	175
Leu Arg Phe Gly Asp Asp Tyr Arg Pro Gly Leu Arg Arg Arg Lys Gln			
180	185		190
Gly Asp Lys Lys Thr Phe Asp Glu Cys Val Ala Glu Gly Ser Asp			
195	200		205
Cys Ala Pro Glu Lys Leu Trp Leu Gln Ile Pro Phe Phe Cys Gly His			
210	215		220
Ser Ser Glu Cys Trp Asn Val Gly Ser Arg Trp Ala Met Asp Gln Ala			
225	230	235	240
Lys Tyr Asn Leu Ile Asn Glu Tyr Phe Leu Val Gly Val Thr Glu Glu			
245	250		255
Leu Glu Asp Phe Ile Met Leu Leu Glu Ala Ala Leu Pro Arg Phe Phe			
260	265		270
Arg Gly Ala Thr Xaa Leu Tyr Arg Thr Gly Lys Ser His Leu Arg			
275	280		285
Lys Thr Thr Glu Lys Lys Leu Pro Thr Lys Gln Thr Ile Ala Lys Leu			
290	295		300
Gln Gln Ser Asp Ile Trp Lys Met Glu Asn Glu Phe Tyr Glu Phe Ala			
305	310	315	320
Leu Glu Gln Phe Gln Phe Ile Arg Ala His Ala Val Arg Glu Lys Asp			
325	330		335
Gly Asp Leu Tyr Ile Leu Ala Gln Asn Phe Phe Tyr Glu Lys Ile Tyr			
340	345		350
Pro Lys Ser Asn			
355			

## 【図面の簡単な説明】

\*ムスターのHS2STのアミノ酸配列のハイドロパシー

## 【図1】 HS2ST部分アミノ酸配列とPCR用プラ

プロット。

イマーの塩基配列を示す図。

## 30 【図3】 チャイニーズハムスター由来のHS2STの

## 【図2】 cDNA配列から予想されるチャイニーズハ\*

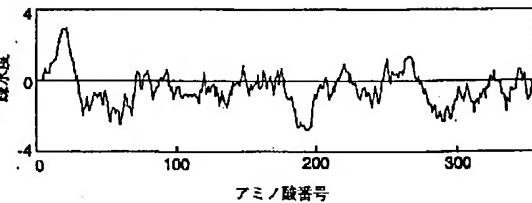
cDNAとヒト由来のHS2STのcDNAの比較。

【図1】

ペプチド1 Asp Leu Cys Ala Lys Asn Arg Tyr His Val Leu His Ile  
 ブライマー-1s 5' GCA AAA AAT CGT TAT CAT GT 3'  
 G C A C C  
 ブライマー-1st 5' CGT TAT CAT GTC TTT CAC AT 3'  
 A C C C C C

ペプチド2 Asp Gln Val Arg Phe Val Lys Asn Ile  
 ブライマー-2a 3' GTT CAI TCI AAA CAI TTT TT 5'  
 C G G C  
 ブライマー-2ai 3' CTA GTT CAI TCI AAA CAI TT 5'

【図2】



(四三)

上段 (') = ヒト由来の H S 2 S T のアミノ酸配列

下段（”）=チャイニーズハムスター由来のH S 2 S Tのアミノ酸配列

1' MGLLRIMMPPKLQLLAYVAFAVANLFLENQIQKLEESRSKLERAIARHEVREIEQRHTMD  
\*\*\*\*\*  
1" MGLLRIMMPPKLQLLAYVAFAVANLFLENQIQKLEESRAKLERAIARHEVREIEQRHTMD

61' GPRQDATLDEEEDIVIYNRVPKTASTSFTNIAYDLCAKNKYHVLHINTTKNNPVMQLD  
\*\*\*\*\*.  
61" GPRQDAAVDEEEDIVIYNRVPKTASTSFTNIAYDLCAKNRHYHVLHINTTKNNPVMQLD

121' QVRFVKNITSWKEMKPGFYHGHSYLDFAKFGVKKPIYINVIRDPIERLVSYYYFLRFG  
\*\*\*\*\*.  
121" QVRFVKNITTWNEMKPGFYHGHSYLDFAKFGVKKPIYINVIRDPIERLVSYYYFLRFG

181' DDYRPGLRRRKQGDKKTDECVAEGGSDCAPEKLWLQIPFFCGHSSECWNVCSRWAMDQA  
\*\*\*\*\*  
181" DDYRPGLRRRKQGDKKTDECVAEGGSDCAPEKLWLQIPFFCGHSSECWNVCSRWAMDQA

241' KYNLINEYFLVGYTEELEDFIMLLEAALPRFFRGATELYRTGKKSHLRKTTEKLPKTQ  
\*\*\*\*\*  
241" KYNLINEYFLVGYTEELEDFIMLLEAALPRFFGATDLYRTGKKSHLRKTTEKLPKTQ

301' IAKLQQSDIWKMENEFYEFALEQFQFIRAHAVREKDGDLYILAQNFFYEKIYPKSN  
\*\*\*\*\*  
301" IAKLQQSDIWKMENEFYEFALEQFQFIRAHAVREKDGDLYILAQNFFYEKIYPKSN

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6  
(C 1 2 N 9/10  
C 1 2 R 1:91)